

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY  
TREATY OF ARS CONSOBATA

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. Januar 2001 (04.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/00845 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/52, 9/78, 9/10, 9/88, 9/12, 1/21, C12P 17/18
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05864
- (22) Internationales Anmeldedatum: 23. Juni 2000 (23.06.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 19929363.5 25. Juni 1999 (25.06.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF-LYNX BIOSCIENCE AG [DE/DE]; D-69120 Heidelberg (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MACK, Matthias [DE/DE]; Mönchhofstr. 3 C, D-69120 Heidelberg (DE). HERBSTER, Karin [DE/DE]; Kolpingstr. 23a, D-76694 Forst (DE).
- (74) Anwalt: GOLDSCHIED, Bettina; BASF Aktiengesellschaft, D-67056 Ludwigshafen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/00845 A1

(54) Title: GENES FROM CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM FOR THE BIOSYNTHESIS OF FOLIC ACID AND THEIR USE FOR THE MICROBIAL PRODUCTION OF FOLIC ACID

(54) Bezeichnung: GENE AUS CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM FÜR DIE FOLSÄUREBIOSYNTHESE UND IHR EINSATZ ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON FOLSÄURE

(57) Abstract: The invention relates to nucleotide sequences of four genes (*folE*, *folP*, *folB* and *folK*) from *Corynebacterium glutamicum* for the biosynthesis of folic acid and their use for the microbial production of folic acid.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung besteht in Nucleotidsequenzen von vier Genen (*folE*, *folP*, *folB* und *folK*) aus *Corynebacterium glutamicum* für die Folsäurebiosynthese und ihr Einsatz zur mikrobiellen Herstellung von Folsäure.

Gene aus *Corynebacterium glutamicum* für die Folsäurebiosynthese und ihr Einsatz zur mikrobiellen Herstellung von Folsäure

## 5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung befaßt sich mit dem Herstellungsverfahren für Folsäure durch Fermentation mit Hilfe eines gentechnisch veränderten Organismus. Diese Erfindung besteht aus den Nucleotidsequenzen von vier Genen (*folE*, *folP*, *folB* und *folK*) aus *Corynebacterium glutamicum* für die Folsäurebiosynthese und deren Einsatz zur mikrobiellen Herstellung von Folsäure. Diese vier Gene bilden ein Operon und werden in der folgenden Reihenfolge transkribiert: *folE*, *folP*, *folB*, *folK*.

15

Folsäure ist essentiell für tierische Organismen. Ihr Derivat Tetrahydrofolat ist in Zellen des tierischen Organismus ein sehr vielseitiger Carrier von aktivierten Einkohlenstoffeinheiten. Folsäure besteht aus drei Gruppen: einem substituierten Pteridinring, *p*-Aminobenzoat und Glutamat. Säuger können einen Pteridinring nicht synthetisieren. Sie nehmen Folsäure mit der Nahrung und von Mikroorganismen in ihrem Darmtrakt auf. Folsäuremangel führt hauptsächlich zu Läsionen in den Schleimhäuten.

20

25 Die kommerzielle Bedeutung der Folsäure liegt im Futtermittel- und Lebensmittelmarkt. Folsäure wird hauptsächlich als Nahrungsmittelzusatz eingesetzt.

Mikroorganismen können zur fermentativen Herstellung von Folsäure eingesetzt werden. Man kann sie durch gentechnische Veränderung des Biosynthesewegs der Folsäure in ihrer Folsäurebiosyntheseleistung optimieren. Gentechnische Veränderung bedeutet in diesem Zusammenhang, die Anzahl der Kopien und/oder die Transkriptionsgeschwindigkeit der Gene des Biosynthesewegs für die Folsäure zu erhöhen. Als Folge davon steigt der Anteil an Genprodukt und damit auch die intrazelluläre Enzymaktivität. Erhöhte Enzymaktivität führt zu einer vermehrten Umwandlungsgeschwindigkeit der Nahrung (z.B. Glucose) zu Folsäure und damit auch zu einer erhöhten Produktkonzentration. Zur gentechnischen Veränderung müssen die Nucleotidsequenzen der Gene des Folsäurebiosynthesewegs identifiziert werden. Diese Erfindung befaßt sich mit vier neuen Gensequenzen für die Folsäurebiosynthese aus *Corynebacterium glutamicum* und mit ihrem Einsatz zur mikrobiellen Herstellung von Folsäure.

40  
45

- Ein Teil der Erfindung besteht im *folE*-Genprodukt. SEQ ID NR. 2 beschreibt eine Polypeptidsequenz. Das *folE*-Genprodukt kodiert ein Polypeptid aus 202 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 22029 Da. Die vorliegende Erfindung befaßt sich auch mit funktionellen Derivaten dieses Polypeptids, die man erhalten kann, wenn man in der SEQ ID NR. 2 durch Deletion, Insertion oder Substitution oder durch eine Kombination von Deletion, Insertion und Substitution eine oder mehrere Aminosäuren, vorzugsweise bis zu 25% der Aminosäuren ersetzt, am besten bis zu 15% der Aminosäuren.
- 5 Mit dem Ausdruck funktionelles Derivat ist gemeint, daß die enzymatische Aktivität des Derivats noch in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Polypeptids mit der Sequenz SEQ ID NR. 2. Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in dem *folP*-Genprodukt. SEQ ID NR. 4 beschreibt eine Polypeptidsequenz. Das *folP*-Genprodukt kodiert ein Polypeptid aus 285 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 29520 Da. Die vorliegende Erfindung befaßt sich auch mit funktionellen Derivaten dieses Polypeptids, die man erhalten kann, wenn man in der SEQ ID NR. 4 durch Deletion, Insertion oder Substitution oder durch eine Kombination von Deletion,
- 10 Insertion und Substitution eine oder mehrere Aminosäuren, vorzugsweise bis zu 40% der Aminosäuren ersetzt, am besten bis zu 25% der Aminosäuren. Mit dem Ausdruck funktionelles Derivat ist gemeint, daß die enzymatische Aktivität des Derivats noch in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Polypeptids mit der Sequenz SEQ ID NR. 4.
- 15

- Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in dem *folB*-Genprodukt. SEQ ID NR. 6 beschreibt eine Polypeptidsequenz. Das *folB*-Genprodukt kodiert ein Polypeptid aus 131 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 14020 Da. Die vorliegende Erfindung befaßt sich auch mit funktionellen Derivaten dieses Polypeptids, die man erhalten kann, wenn man in der SEQ ID NR. 6 durch Deletion, Insertion oder Substitution oder durch eine Kombination von Deletion, Insertion und Substitution eine oder mehrere Aminosäuren,
- 20 vorzugsweise bis zu 30% der Aminosäuren ersetzt, am besten bis zu 20% der Aminosäuren. Mit dem Ausdruck funktionelles Derivat ist gemeint, daß die enzymatische Aktivität des Derivats noch in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Polypeptids mit der Sequenz SEQ ID NR. 6.
- 25

- 40 Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in dem *folK*-Genprodukt. SEQ ID NR. 8 beschreibt eine Polypeptidsequenz. Das *folK*-Genprodukt kodiert ein Polypeptid aus 160 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 18043 Da. Die vorliegende Erfindung befaßt sich auch mit funktionellen Derivaten dieses Polypeptids, die man erhalten kann, wenn man in der SEQ ID NR. 8 durch Deletion, Insertion oder Substitution oder durch eine Kombination von Deletion,
- 45

Insertion und Substitution eine oder mehrere Aminosäuren, vorzugsweise bis zu 40% der Aminosäuren ersetzt, am besten bis zu 30% der Aminosäuren. Mit dem Ausdruck funktionelles Derivat ist gemeint, daß die enzymatische Aktivität des Derivats noch in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Polypeptids mit der Sequenz SEQ ID NR. 8.

Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in den Polynucleotidsequenzen, die die oben beschriebenen Polypeptide kodieren. Die Polynucleotidsequenzen lassen sich ausgehend von Sequenzen, die man aus *Corynebacterium glutamicum* isoliert (d.h. SEQ ID NR. 1, 3, 5 und 7), erzeugen, in dem man diese Sequenzen durch ortsgerichtete Mutagenese modifiziert oder nach Rückübersetzung des entsprechenden Polypeptids mit dem genetischen Code eine chemische Total-synthese ausführt.

Diese Polynucleotidsequenzen lassen sich vorzugsweise einsetzen zur Transformation von Wirtsorganismen, und hierbei vorzugsweise von Mikroorganismen, und zwar in Form von Genkonstrukten, die zumindest eine Kopie eines dieser Polynucleotide zusammen mit mindestens einer regulatorischen Sequenz enthalten. Regulatorische Sequenzen beinhalten Promotoren, Terminatoren, Verstärker und ribosomale Bindungsstellen.

Bevorzugte Wirtsorganismen für die Transformation mit diesen Genkonstrukten sind *Corynebacterium*- und *Bacillus*-Arten. Auch jeden beliebigen eukaryontischen Mikroorganismus kann man einsetzen, vorzugsweise Hefestämme der Gattung *Ashbya*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* und *Hansenula*.

Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in dem Verfahren zur Herstellung von Folsäure durch Kultivierung eines Wirtsorganismus, der in der oben beschriebenen Art transformiert ist, und in der nachfolgenden Isolierung der Folsäure.

Die Verfahren und die Vorgehensweisen zur Kultivierung von Mikroorganismen und zur Isolierung von Folsäure aus einer mikrobiellen Produktion sind dem geschulten Personal geläufig.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung genauer beschrieben, ebenso ihre Anwendung zur gentechnischen Veränderung von Mikroorganismen zur Steigerung der Syntheseleistung von Folsäure.

## Beispiel 1

Darstellung einer Genombibliothek aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

5

- DNA aus dem Genom von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 läßt sich nach Standardmethoden gewinnen, die bereits beschrieben sind, z. B. von J. Altenbuchner und J. Cullum (1984, Mol. Gen. Genet. 195:134-138). Die Genombibliothek läßt sich nach Standard-
- 10 vorschritten (z.B.: Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) mit jedem beliebigen Klonierungsvektor herstellen, z.B. pBluescript II KS- (Stratagene) oder ZAP Express™ (Stratagene). Dabei kann man jede beliebige Fragmentgröße benutzen, vorzugsweise Sau3AI-Frag-
- 15 mente mit einer Länge von 2-9 kb, die sich in Klonierungsvektoren mit verdautem *Bam*HI einbinden lassen.

## Beispiel 2

## 20 Analyse der Nucleinsäuresequenz der Genombibliothek

- Einzelne *E. coli*-Klone kann man aus der im Beispiel 1 dargestellten Genombibliothek auswählen. *E. coli*-Zellen werden nach Standardvorfahren in geeigneten Medien kultiviert (z.B. LB ergänzt
- 25 mit 100 mg/l Ampicillin), danach läßt sich die Plasmid-DNA isolieren. Klont man Genomfragmente aus der DNA von *Corynebacterium glutamicum* in pBluescript II KS- (siehe Beispiel 1), läßt sich die DNA mit Hilfe der Oligonucleotide 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3' und 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' sequenzieren.

30

## Beispiel 3

Computeranalyse der Sequenzen der isolierten Nukleinsäuren

- 35 Die Nucleotidsequenzen lassen sich z.B. mit Hilfe des BLASTX-Algorithmus (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410) aneinanderfügen. Auf diesem Weg kann man neuartige Sequenzen entdecken und die Funktion dieser neuartigen Gene aufklären.

## 40 Beispiel 4

- Identifizierung eines *E. coli*-Klons, der eine Nucleotidsequenz des Gens für die GTP-Cyclohydrolase I (EC 3.5.4.16) enthält
- Bei der Analyse der *E. coli*-Klone, wie sie im Beispiel 2 be-
- 45 schrieben wurde, an die sich die im Beispiel 3 beschriebene Analyse der dabei erhaltenen Sequenzen anschloß, ergab sich eine Sequenz, wie sie mit SEQ ID NR. 1 beschrieben ist. Bei der Anwen-

## 5

dung des BLASTX-Algorithmus (siehe Beispiel 3) ergab diese Sequenz Ähnlichkeit mit GTP-Cyclohydrolasen I (FolE; EC 3.5.4.16) aus verschiedenen Organismen. Die größte Ähnlichkeit war mit der GTP-Cyclohydrolase-I (FolE) aus *Mycobacterium tuberculosis* (NRDB 5 006273; 72% Übereinstimmung auf der Stufe der Aminosäuren).

## Beispiel 5

Identifizierung eines *E. coli*-Klons, der eine Nucleotidsequenz  
10 des Gens für die Dihydropteroat-Synthase (EC 2.5.1.15) enthält

Bei der Analyse der *E. coli*-Klone, wie sie im Beispiel 2 beschrieben wurde, an die sich die im Beispiel 3 beschriebene Analyse der dabei erhaltenen Sequenzen anschloß, ergab sich eine  
15 Sequenz, wie sie mit SEQ ID NR. 3 beschrieben ist. Bei der Anwendung des BLASTX-Algorithmus (siehe Beispiel 3) ergab diese Sequenz Ähnlichkeit mit Dihydropteroat-Synthasen (FolP; EC 2.5.1.15) aus verschiedenen Organismen. Die größte Ähnlichkeit war mit der Dihydropteroat-Synthase (FolP) aus *Mycobacterium tu-*  
20 *berculosis* (NRDB 006274; 53% Übereinstimmung auf der Stufe der Aminosäuren).

## Beispiel 6

25 Identifizierung eines *E. coli*-Klons, der eine Nucleotidsequenz des Gens für die Dihydroneopterin-Aldolase (EC 4.1.2.25) enthält

Bei der Analyse der *E. coli*-Klone, wie sie im Beispiel 2 beschrieben wurde, an die sich die im Beispiel 3 beschriebene  
30 Analyse der dabei erhaltenen Sequenzen anschloß, ergab sich eine Sequenz, wie sie mit SEQ ID NR. 5 beschrieben ist. Bei der Anwendung des BLASTX-Algorithmus (siehe Beispiel 3) ergab diese Sequenz Ähnlichkeit mit Dihydroneopterin-Aldolasen (FolB; EC 4.1.2.25) aus verschiedenen Organismen. Die größte Ähnlichkeit  
35 war mit der Dihydroneopterin-Aldolase (FolB) aus *Mycobacterium tuberculosis* (NRDB 006275; 61% Übereinstimmung auf der Stufe der Aminosäuren).

## Beispiel 7

40

Identifizierung eines *E. coli*-Klons, der eine Nucleotidsequenz des Gens für die 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridin-pyrophosphokinase (EC 2.7.6.3) enthält

45 Bei der Analyse der *E. coli*-Klone, wie sie im Beispiel 2 beschrieben wurde, an die sich die im Beispiel 3 beschriebene Analyse der dabei erhaltenen Sequenzen anschloß, ergab sich eine

Sequenz, wie sie mit SEQ ID NR. 7 beschrieben ist. Bei der Anwendung des BLASTX-Algorithmus (siehe Beispiel 3) ergab diese Sequenz Ähnlichkeit mit 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridin-pyrophosphokinasen (FolK; EC 2.7.6.3) aus verschiedenen 5 Organismen. Die größte Ähnlichkeit war mit der 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridin-pyrophosphokinase (FolK) aus *Mycobacterium leprae* (EMBL AL023093; 43% Übereinstimmung auf der Stufe der Aminosäuren).

#### 10 Beispiel 8

Einsatz der Gene für die GTP-Cyclohydrolase I, für die Dihydropteroat-Synthase, für die Dihydroneopterin-Aldolase und für die 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridin-pyrophosphokinase aus *Corynebacterium glutamicum* zur Herstellung von Folsäure 15

Die Gene für die GTP-Cyclohydrolase I, für die Dihydropteroat-Synthase, für die Dihydroneopterin-Aldolase und für die 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridin-pyrophosphokinase aus *Corynebacterium glutamicum* lassen sich mit Hilfe geeigneter Klonierungs- und Expressionssysteme in *Corynebacterium glutamicum* oder in jeden beliebigen anderen Mikroorganismus einbringen. Man kann gentechnisch veränderte Mikroorganismen herstellen, die sich vom Wildtyp-Organismus hinsichtlich der 25 Aktivität oder der Anzahl der Genkopien unterscheiden. Diese neuartigen, gentechnisch veränderten Stämme lassen sich zur Herstellung von Folsäure einsetzen.

#### Sequenzliste

30

##### (I) Allgemeine Angaben

##### (1) Anmelder:

35	(A) Name:	BASF-LYNX Bioscience AG
	(B) Straße:	Im Neuenheimer Feld 515
	(C) Stadt:	Heidelberg
	(D) Land:	Deutschland
	(E) Postleitzahl:	69120
40	(F) Telephon:	06221/4546
	(G) Telefax:	06221/454770
	(2) Titel:	Gene aus <i>Corynebacterium glutamicum</i> für die Biosynthese der Folsäure und ihr Einsatz zur mikrobiellen Herstellung von Folsäure
45		

(3) Anzahl der Sequenzen: 8

SEQ ID NR. 1: DNA (*folE*)

5 ATGAAGGAGACAACCGTGGATAACCACGCTGCAGTTCGCGAGTTCGATGAGGAGCGCGCAACAGC  
TGCGATTCTGAGTTGCTCATCGCTGTGGGTGAGGATCCAGATCGCGAAGGCCTGTTGGAAACCC  
CAGCTCGAGTGGCTAGGGCGTACAAGGAACTTTCCGGGTCTGCATGAGGATCCCACCACTGTG  
CTGGAGAAGACGTTCTCTGAGGGCCATGAAGAGTTGGTTCTGGTTCGTGAGATCCCGATTTACTC  
CATGTGTGAGCACCACCTTGGTGCCGTTCTTTGGCGTGGCGCACATTGGTTACATTCCGGGTAAAGT  
10 CCGGCAAGGTGACTGGCCTGTCCAAGCTGGCGCGTTTAGCGGATATGTTTGCTAAGCGACCTCAG  
GTTTACAGGAGCGCTTGACCTCCCAAATTGCGGATGCTCTCGTCGAAAAGCTTGATGCCAGGCCGT  
GGCCGTGGTGAAGCTGAGCACCTGTGCATGGCCATGCGCGGAATCCGTAAGCCTGGTGCTG  
TGACCACGACGCTCTGCGGTGCGCGCGGTTTAAAGAACAACGCTGCCTCCCGCGCTGAGGTGTTT  
TCCCTGATTCTGGGGGCACTAA

15

SEQ ID NR. 2: Aminosäure (*FolE*)

MKETTVDNHAAVREFDEERATAAIRELLIAVGEDPDREGLLETPARVARAYKETFAGLHEDPTTV  
LEKTFSEGHEELVLVREIPIYSMCEHHLVFFGVAHIGYIPGKSGKVTGLSKLARLADMFARPKQ  
20 VQERLTSQIADALVEKLDAQAVAVVIEAEHLCMAMRGIRKPGAVTTTSAVRGGFKNNAASRAEVF  
SLIRGH

SEQ ID NR. 3: DNA (*folP*)

25 ATGAACGTATCCTCTTTGACCATCCCGGGACGCTGTTTGGTCATGGGAATTGTCAATGTCACTGA  
GGATTCTTTTTCGGACGGTGGCAAGTACATTGACGTTGATCAGGCGATCGCGCATGCCAAGGAAT  
TGGTGGCTGCTGGCGCCGACATGATTGATGTGCGCGGCGAGTCCACCCGGCCTGGGGCAGTGCGC  
GTCGACGCGTCCGTGGAACGGGACCGGGTTGTGCCGGTCATTAAAGGCGCTTCACGACGCCGGCAT  
CCACACTTCCGTAGACACCATGCGGGCCTCCGTGGCGCAGGCTGCCCGGGGCGCTGGCGTCTCCA  
30 TGATCAACGACGCTCTCTGGCGGTTTGGCTGATCCTGAGATGTTTTCTGTATGGCGGAAGCGCAA  
ATTCCCCTGTGTTTGTATGCACTGGCGCACCCCTCCAATTCCGGTGATGCCCGAGGTCAGGCAGATCA  
CGGTGGAGACGTTGTAGCCGATGTGCACGCAGTGCTTGATGATCTTGTGCCCCGCGCCACCGCTG  
CTGGTGTGGCCGAAAACCAGATCGTGCTTGATCCAGGTTTGGGTTTGGCCAAATCACGTGAAGAC  
AACTGGCGTTTGTCTGCAAGCACTGCCCGAGTTTATTTCTGGACCTTTCCCATCCTGGTGGGAGC  
35 ATCCCGGAAGCGATTCTTGCTGGCTGGCGTGCAGCAAGACCGTGGCCTAGATGTCACCCCATTTGATG  
CCGACCCAGCAACCGCAGCGGTGACCGCAGTGTCTGCACATATGGGAGCATGGGGTGTGCGCGTG  
CACGATGTCCAGTATCAAGGGACGCTGTTGATGTTGCCGCATTGTGGCGAAGTGAGGAAGTCA  
CCATGGCTGA

40 SEQ ID NR. 4: Aminosäure (*FolP*)

MNVSSLTIPGRCLVMGIVNVTEDSFSDGGKYIDVDQAIAHAKELVAAGADMIDVGGESTRPGAVR  
VDASVERDRVVPVIKALHDAGIHTSVDTMRASVAQAAAGAGVSMINDVSGGLADPEMFVMAEAQ  
IPVCLMHWRTLQFGDAAGQADHGGDVVADVHAVLDDLVARATAAGVAENQIVLDPGLGFAKSRED  
45 NWRLQLALPEFISGFFPILVGASRKRFAGVRKDRGLDVTPIADAPATAAVTAVSAHMGAWGVRV  
HDVPVSRDAVDVAALWRSRGTHHG



SEQ ID NR. 5: DNA (*folB*)

ATGGCTGATCGTATTGAACTTAAAGGCCTTGAATGCTTCGGACACCACGGTGTGTTCGACTTTGA  
AAAAGAGCAAGGCCAGCCCTTCATTGTGGATGTACCTGCTGGATGGATTTTCGATGCCGCAGGTG  
5 CCAGCGATGACCTTTCCGACACCGTAGATTACGGCGCGTTGGCATTGTTGGTTGCTGAAATCGTG  
GAAGGCCCATCCAGGGATTGATCGAGACGGTGGCCACGGAATCTGCGGATGCTGTGATGGCTAA  
ATTTGATGCGCTTCATGCGGTGGAAGTAACCATCCATAAGCCCAAAGCACCGATCCACGTACTT  
TTGCTGACGTCGCGGTGGTTGCCCCGACGTTCCAGGAAATCCATGGCTGCTGGAAGGAGCAACGCC  
TAA

10

SEQ ID NR. 6: Aminosäure (*FolB*)

MADRIELKGLECFGHHGVDFEKEQGQPFIVDVTWCWMDFDAAGASDDLSDTVDYGALALLVAEIV  
EGPSRDLIETVATESADAVMAKFDALHAVEVTIHKPKAPIPRTFADVAVVARRSRKSMAAGRSNA

15

SEQ ID NR. 7: DNA (*folK*)

ATGCATGCAGTTTTGTCCATCGGTTCCAACATGGATGATCGCTACGCGCTGCTCAACACAGTGAT  
CGAGGAATTCAAAGATGAGATCGTGGCGCAGTCTGCGATCTACTCAACCCACCGTGGGGCATTG  
20 AGGATCAGGATGAATTCCTCAACGCAGTGCTCGTTGTTGAGGTTGAAGAAACCCCATCGAGTTG  
CTGCGCCGTgGCCAAAACTCGAAGAAGCCGCCGAGCGGTCGCGTCCGCAAATGGGGGCCACG  
CACCTCGATGTGGATATCGTGCAGATCATTAAGATGGGGAAGAGATCCTTTCTGAGGATCCCG  
AACTGACCTTGCCACACCCTTGGGCTTGGCAGCGTGCCCTTCGTGTTGATCCCTTGGTTGGAAGCA  
GAACCTGATGCCGTCCTGCACGGCACGACCATTCAGAACATGTGGATAATCTTGATCCCACAGA  
25 CATTGAAGGTGTCACCAAGATTTAA

SEQ ID NR. 8: Aminosäure (*FolK*)

MHAVLSIGSNMDDRYALLNTVIEEFKDEIVAQSAIYSTPPWGIEDQDEFLNAVLVVEVEETPIEL  
30 LRRGQKLEEAERVRVRKWGPRTLVDVQIIKDGEEILSEDPELTLPHPWAWQRAFLIPWLEA  
EPDAVLHGTTIAEHVDNLDPTDIEGVTKI

35

40

45

## Patentansprüche

1. Ein Polypeptid mit GTP-Cyclohydrolase-I-Aktivität, das aus  
5 folgender Gruppe ausgewählt ist:
- (a) ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in der  
SEQ ID NR. 2 beschrieben ist
- 10 (b) ein Polypeptid das im Vergleich zu dem in (a) durch Dele-  
tion, Insertion oder Substitution einer oder mehrerer  
Aminosäuren verändert ist.
2. Ein Polypeptid mit Dihydropteroat-Synthaseaktivität, das aus  
15 folgender Gruppe ausgewählt ist:
- (a) ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in der  
SEQ ID NR. 4 beschrieben ist;
- 20 (b) ein Polypeptid das im Vergleich zu dem in (a) durch Dele-  
tion, Insertion oder Substitution einer oder mehrerer  
Aminosäuren verändert ist.
3. Ein Polypeptid mit Dihydroneopterin-Aldolaseaktivität, das  
25 aus folgender Gruppe ausgewählt ist:
- (a) ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in der  
SEQ ID NR. 6 beschrieben ist
- 30 (b) ein Polypeptid, das im Vergleich zu dem in (a) durch  
Deletion, Insertion oder Substitution einer oder mehrerer  
Aminosäuren verändert ist.
4. Ein Polypeptid mit 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydro-  
35 teridin-pyrophosphokinaseaktivität, das aus der folgenden  
Gruppe ausgewählt ist:
- (a) ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in der  
SEQ ID NR. 8 beschrieben ist
- 40 (b) ein Polypeptid, das im Vergleich zu (a) durch Deletion,  
Insertion oder Substitution einer oder mehrerer Amino-  
säuren verändert ist.

45

## 10

5. Ein Polynucleotid, das ein dem Anspruch 1, 2, 3 oder 4 entsprechendes Polypeptid kodiert.

5 6. Ein Genkonstrukt mit mindestens einer Kopie eines dem Anspruch 5 entsprechenden Polynucleotids zusammen mit mindestens einer regulatorischen Sequenz.

7. Ein Wirtsorganismus, der mit einem dem Anspruch 6 entsprechenden Genkonstrukt transformiert ist.

## 10

8. Verfahren zur Herstellung von Folsäure durch Kultivieren eines dem Anspruch 7 entsprechenden Wirtsorganismus mit nachfolgender Isolierung der Folsäure.

## 15

## 20

## 25

## 30

## 35

## 40

## 45

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.  
PCT/EP 00/05864

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/52 C12N9/78 C12N9/10 C12N9/88 C12N9/12  
C12N1/21 C12P17/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, WPI Data, PAJ, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession Z95557 AL123456, 20 May 1997 (1997-05-20) COLE S T ET AL: "Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 153/162" XP002153566 cited in the application the whole document	1-3,5
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession U72662; U60993, 19 November 1996 (1996-11-19) CHISTOSERDOVA L ET AL: "Methylobacterium extorquens methylotrophy region containing ... XP002153567 the whole document	4,5
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 November 2000

Date of mailing of the international search report

04/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/05864

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 761 818 A (TORAY INDUSTRIES) 12 March 1997 (1997-03-12) the whole document	
A	IWAI K ET AL: "OCCURRENCE OF CRITHIDIA FACTORS AND FOLIC-ACID IN VARIOUS BACTERIA" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 104, no. 1, 1970, pages 197-201, XP000960985 ISSN: 0021-9193 the whole document	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05864

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0761818 A	12-03-1997	CN 1149626 A	14-05-1997
		JP 9121881 A	13-05-1997
		US 5968788 A	19-10-1999
		JP 9121882 A	13-05-1997

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen  
PCT/EP 00/05864

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES			
IPK 7	C12N15/52 C12N1/21	C12N9/78 C12P17/18	C12N9/10 C12N9/88 C12N9/12
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK			
B. RECHERCHIERTE GEBIETE			
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C12P			
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen			
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, WPI Data, PAJ, STRAND			
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN			
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile		Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession Z95557 AL123456, 20. Mai 1997 (1997-05-20) COLE S T ET AL: "Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 153/162" XP002153566 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument		1-3,5
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession U72662; U60993, 19. November 1996 (1996-11-19) CHISTOSERDOVA L ET AL: "Methylobacterium extorquens methylotrophy region containing ..." XP002153567 das ganze Dokument		4,5
-/-			
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie			
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist			
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
22. November 2000		04/12/2000	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Lejeune, R	

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Abzeichen

PCT/EP 00/05864

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 761 818 A (TORAY INDUSTRIES) 12. März 1997 (1997-03-12) das ganze Dokument	
A	IWAI K ET AL: "OCCURRENCE OF CRITHIDIA FACTORS AND FOLIC-ACID IN VARIOUS BACTERIA" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 104, Nr. 1, 1970, Seiten 197-201, XP000960985 ISSN: 0021-9193 das ganze Dokument	



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abkürzungszeichen

PCT/EP 00/05864

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0761818 A	12-03-1997	CN 1149626 A	14-05-1997
		JP 9121881 A	13-05-1997
		US 5968788 A	19-10-1999
		JP 9121882 A	13-05-1997